

氷雪ラン藻 *Phormidesmis priestleyi* の生理学的特性

矢野 充啓*, 小杉 真貴子**, 植竹 淳***, 諏訪 裕一*, 小池 裕幸*

Physiological characterization of the cold tolerant cyanobacterium, *Phormidesmis priestleyi*

YANO, Mitsuhiro*, KOSUGI, Makiko**, UETAKE, Jun***, SUWA, Yuichi*,
KOIKE, Hiroyuki*

Cryoconite granules, composed of microorganisms, biological debris, and minerals, are found worldwide in supraglacial habitats. Cryoconite granules attract attention because they involve the darkening of glaciers to accelerate glacier melting. Cyanobacteria are the primary producer of cryoconite granules. Although they are expected to be tolerant against low temperature, freezing, and high light stresses, their physiological responses to environmental stresses have yet to be studied well. *Phormidesmis priestleyi* is one of the dominant cyanobacteria in Arctic cryoconite. In this study, we investigated the photosynthetic properties of *P. priestleyi* isolated from a glacier in Greenland. We analyzed its photosynthetic responses against temperature change, freezing, and dehydration. It was demonstrated that *P. priestleyi* is not psychrophilic but has a cold-tolerant feature, including photosynthetic activity around zero degrees. The ability to recover from the freezing treatment was confirmed after cold acclimation. On the other hand, *P. priestleyi* didn't show dehydration tolerance. These results suggest that water is retained within the cells under freezing conditions despite the osmotic pull of water from the surrounding environment. In addition, the acetylene reduction activity showed light-dependent nitrogenase activity in the isolated strain at a low temperature. The carbon and nitrogen fixation activities of *P. priestleyi* at a low temperature may be advantageous for propagating species in glacial habitats.

1. 序論

1870年に行われたグリーンランド氷帽横断遠征の際、スウェーデン系フィンランド人探検家の Adolf Erik Nordenskiöld が氷の解けた穴の中に黒い堆積物が凝集しているのを発見した。彼はこれをクリオコナイトと名付けた[1]。クリオコナイトは鉱物などの無機物や微生物およびその腐植物質を糸状性の光合成生物が取り巻く事で形成される直径約1mmの球体である。有色の鉱物や生物細胞が光を吸収することによって、氷河の太陽光の反射率が下がり氷河の融解が促進される現象が報告されている[2,3,4]。この現象によりクリオコナイトは地球温暖化による氷河融解を加速させる要因のひとつとして地球科学、雪氷学分野において注目を集めている。これまでに世界各地の氷河に形成されるクリオコナイト粒の微生物叢解析により、クリオコナイトを構成する生物種構成が明らかにされてきた。糸状性ラン藻は一次生産者としてだけでなくクリオコナイトの群集構造を形成する重要な役割を持っており[2,3]、*Phormidesmis*, *Phormidium*, *Leptolyngbia*, *Nostoc* 属などが報告されている[5,6,7,8]。またアフリカの氷河では蘚類の糸状性の原糸体が主構成種となる例も報告されている[9]。こうした光合成生物によって大気中から固定される炭素がクリオコナイト内に形成される微生物生態系への有機炭素の供給原となる。氷河上では炭素源だけではなく生物が利用可能な窒素源も限られているため、クリオコナイトの窒素循環についてもこれまでアセチレン還元法や安定同位体窒素を用いた活性測定や次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析から議論がなされてきた[5,10,11,12]。バクテリアやラン藻の一部の種はニトロゲナーゼをコードする *nif* 遺伝子を持ち大気中の窒素を固定する能力を有するが、窒素固定には多くのエネルギーが必要である上にニトロゲナーゼ活性は低温で大きく抑制される。クリオコナイトを構成するバクテリアの中には、硝酸菌、亜硝酸菌、窒素固定細菌の存在が報告されており、窒素固定と環境中のアンモニアや硝酸イオンにより窒素が供給されていると考えられている[12]。クリオコナイトの主構成ラン藻である *Leptolyngbia* や *Nostoc* は *nif* 遺伝子を持ち窒素固定を行うことが知られているが、中国の氷河で採集された *Leptolyngbia* を主構成種とするクリオコナイト

*中央大学 理工学部生命科学科, 〒112-8551 文京区春日1-13-27

**基礎生物学研究所 環境光生物学研究部門, 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38

***北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター 森林園ステーション, 〒053-0035 北海道苫小牧市宇高丘

では、ラン藻の *nif* 遺伝子は検出されるものの mRNA の発現が確認されなかったことから、ラン藻は窒素固定に寄与していないとされている[12].

クリオコナイトを構成するラン藻は植物生理学の観点からも非常に興味深い存在である。春先の雪上に出現する微細藻類のブルームである赤雪や緑雪は好冷性の藻類が引き起こすことが有名であるが、その優占種はクラミドモナスなどの緑藻である[13]. 海水の下に着生して生育する藻類としては、アイスアルジーが知られているが、これは珪藻や渦鞭毛藻が優占する[14]. 一方、酸素発生型光合成生物の共通祖先にあたるラン藻は、好冷性の種が未だに確認されていない。寒冷地に生育する種は耐冷性で 0°C 付近では代謝が著しく低下するため、日射によって温度が上昇する露岩域の雪解け水や、氷河の融解水を利用して生育している。温度が 0°C 付近に保たれるような氷河上あるいは雪上に生育するラン藻は非常に限られている。このことからクリオコナイトを形成するラン藻は現状知られているラン藻とは異なる生理学的特性をもつ可能性が高い。

本研究ではグリーンランドのカナック氷河から単離された氷雪ラン藻 *Phormidesmis priestleyi* [15] の生理学的性質を明らかにすることを目的とする。*P. priestleyi* は世界各地の雪氷圏において氷河上の堆積物中に特に多く見つかるラン藻で、クリオコナイトの主構成光合成生物となることも多い[6,7,16]. 糸状性の細胞は互いに絡まりやすく、周囲の鉱物を巻き込みながらクリオコナイト粒を形成する。同じくクリオコナイトの優占種となる *Leptolyngbia* や *Nostoc* 属などのコスモポリタンなラン藻とは異なり、*Phormidesmis* は雪氷圏以外の環境で優占することが稀であることから、氷河上の環境に適応進化した種である可能性がある[17].

一般的に極域や、高山帯は光合成生物にとっての極限環境であり、ここに生育する光合成生物は低温や凍結、乾燥や強い直射日光、貧栄養といった様々なストレスに晒されている。極域の生物は夏期の短い融解—凍結サイクルと冬期の非常に長い凍結に耐えられなければ生存することが出来ないため、低温・凍結ストレスに対する耐性機構は生物の増殖に深く関わっていると考えられる。比較的知見の多い赤雪・緑雪を構成する藻類に関してもどのようにして短長期の凍結をしのぎ、非常に広範囲にわたって分布しているか未だに解明されていない。クリオコナイトの形成メカニズムは、氷河の上流に存在するクリオコナイトが下流に流れる過程で転がり、丸く、大きくなるものと予想されているが[18], 構成種の生理学的特性に基づき、クリオコナイトの生理生態について研究された例は少ない。特に凍結は氷河上では避けられないストレス因子のひとつである。極域の生物は凍結によって、利用可能な液体としての水がなくなることで擬似的な乾燥状態に置かれるため、乾燥にも耐性をしめすことが知られており、ラン藻に関しては乾燥耐性を持つことが極域での生育に不可欠であるとされている[19]. 強光や紫外線も光合成生物の生育に大きな影響を及ぼすストレス因子である。光合成は光によって駆動する電子伝達系とそこで生成される還元力を利用した炭酸固定系から成り立っている。炭酸固定はルビスコの酵素反応によって行われるため、低温環境ではその活性が著しく抑制される。この活性の低下に伴い光合成反応の上流側である電子伝達系が過還元状態に陥ると余剰のエネルギーを熱や蛍光として処理する機構が活性化される。処理しきれないほどの余剰エネルギーが生じると活性酸素の生成により光損傷を引き起こす[20,21]. 相対的電子伝達速度 (rETR) を光強度に対してプロットすることで得られる光—光合成曲線は電子伝達系や炭酸固定系の活性の指標となる[22]. 光合成生物は過剰な光エネルギーが光合成系を破壊しないように遮光性物質の蓄積や、ステート遷移、過剰な光エネルギーの熱散逸機構を有する。ラン藻は一部の種でオレンジカロテノイドプロテインによる光エネルギーの熱散逸機構を持つことが知られているが、一般的に強光に対する防護機構はスキトネミンやカロテノイド色素の蓄積による遮光とステート遷移が主であるとされている[23]. ステート遷移は電子伝達系において光化学系II (系II) と光化学系I (系I) 間に分配される光を調整するためのシステムであり、系IIの過剰な励起をおさえるために重要である[24]. 一方で乾燥耐性種のラン藻や真核藻類において、乾燥誘導性の非光化学的消光の存在が知られている。乾燥状態では細胞内の 90% 以上の水が失われ光合成やその他の代謝は完全に停止するため、光合成色素に吸収された光エネルギーは行き場を失い活性酸素を生じ細胞を損傷する原因となる。乾燥耐性種ではこれを防止する機構として、乾燥時に光エネルギーを速やかに熱散逸するためのクエンチャー分子の存在が提唱されており、乾燥に伴う光化学系の蛍光消光と再吸水時の速やかな蛍光の回復が起こることが知られている[25,26].

本研究では、*P. priestleyi* の強光や低温、凍結といった環境ストレスに対する生理学的特性を解析することとで雪氷圏に生育するラン藻の適応戦略を明らかにするとともに、一次生産者であるラン藻がクリオコナイト粒の生態学的な振る舞いに与えている影響について論じる。

2. 材料と方法

2. 1. 材料

1) *Phormidesmis priestleyi* QA1 株

本種はグリーンランド北西部のカナック氷帽から植竹によって単離された。これを、光源として TOSHIBA 社の 3 波長昼光色蛍光灯 メロク 50 (PAR: 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を用いて 20°C, 10 倍希釈した BG11 液体培地[27] (以下 1/10 BG11 と記載) で毎分 140 回の速度で 1 か月振とう培養した。

2) クリオコナイト

ノルウェー・スバル諸島のスピッツベルゲン島, ニーオルスン, 東ブレッガー氷河 (N78°53'38.7", E11°49'08.5"), (N78°53'41.03", E11°50'28.76") にて採集され 0°C に保った状態で研究室まで輸送された後, 2°C, 白色 LED (PAR: 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) のインキュベーターで保管されているものを使用した。

3) *Anabaena* sp. PCC 7120

陸棲のラン藻で乾燥耐性を持つことで知られる。野生株を 25°C, 光源として TOSHIBA 社のフィッシュルックス赤色蛍光灯 (PAR 25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を用いて, CO₂濃度を 3~5%程度に高めた空気を通気する条件で BG11 液体培地[27]を使用し培養した。

4) *Synechocystis* sp. PCC 6803

単細胞性の淡水生ラン藻で乾燥耐性は持たない。3) の *Anabaena* 株と同様の条件で培養した。

5) *Nostoc commune*

陸棲のラン藻で乾燥耐性種である。群馬県草津市や静岡県葵区羽鳥で採取したものをを用いた。一晩水道水に浸けて室温で膨潤させ、小枝や小石などを取り除き洗浄した後に再び乾燥させた。乾燥状態でビニール袋の中に入れて密閉した状態にし、室温で保管した。実験では、この洗浄済みの *N. commune* を約 30 倍の体積の MilliQ 水で膨潤させ、一晩暗所に室温で静置したのち使用した。

2. 2. 異なる温度における電子伝達活性の光強度依存性

クリオコナイト, *P. priestleyi* の光-光合成曲線を求めた。サンプルを各測定温度で 30 分置き、温度に慣らした後に PAM クロロフィル蛍光測定機 (Water PAM fiber type, Walz, Germany) を用いて測定した。PAM クロロフィル蛍光測定は、測定パルス光により検出される同周期のクロロフィル蛍光をモニタリングすることで、励起光による蛍光への寄与を受けずに光化学系の蛍光収率 (吸収された光子のうち蛍光として放出される割合) を計測できるシステムである。測定光である弱いパルス光のみを試料に照射したときの蛍光を最小蛍光 (F_0) とした。飽和パルス光により系 II の安定なキノン受容体である Q_A の完全還元状態がもたらされ、最大蛍光 (F_m) が得られる。 F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$) より求められる系 II の最大量子収率 (光がどの程度系 II で光合成に利用されたかの割合) を系 II の活性変化の指標とした。電子伝達系と炭酸固定回路までを含めた光合成反応が起こる程度の励起光を照射し得られる最大蛍光を F_m' とし、1 分ごとに飽和光を当てることによって電子伝達系全体に電子が流れている状態での量子収率を F_v'/F_m' ($F_v' = F_m' - F_0$) より求めた。これは有効量子収率と定義され、これに励起光量をかけた値は相対的な電子伝達速度 (rETR: relative electron transport rate) と定義される。本研究では励起光を 9 分間照射したときの値を記録した。

2. 3. 凍結耐性測定

20°C で培養した *P. priestleyi* を低温環境に馴化させるため 4°C で 1 週間インキュベーションした。この間

光源として TOSHIBA 社の植物培養用白色蛍光灯で ($\text{PAR} : 20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) の光を照射した。その後、PAM クロロフィル蛍光測定機を用いて 20°C での光飽和曲線を求めた後、 -25°C の冷凍庫で一晩保存し凍結処理を行った。翌日、凍結試料を解冻し 20°C における光飽和曲線を求めた。更に凍結による障害からの光合成活性回復過程を調べるため、サンプルを培養条件でインキュベートし 20°C における電子伝達活性の光飽和曲線を求めた。

2. 4. 乾燥耐性測定

乾燥状態を作るために、吸水状態で測定を終えたサンプルを寒天上に静置し 1 週間暗所にて乾燥させた。これを乾燥状態とし光一光合成曲線の測定を行った。その後寒天をはがし、下に HEPES-NaOH (pH 7.5) を含ませたキムワイブを敷き、1 日暗所で膨潤させた。これを再吸水個体として測定を行った。

2. 5. 酸素電極による光合成活性測定

測定にはランクブラザーズ社の酸素電極を用いた。励起には CABIN 社のプロジェクターを用いた。光量は $600 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。測定には NaHCO_3 を 1 mM になるように加え、*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120, *P. priestleyi* の各試料をクロロフィル濃度が $15 \mu\text{g/ml}$ になるように加え HEPES-NaOH (pH7.5) で総量 2 ml に合わせて炭酸固定活性を測定した。測定時の温度は DESAGA 社の定温水循環装置 FRIGOSTAT によって *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120 では 25°C , *P. priestleyi* では 18°C に保ち測定した。出力信号は理化電機 R-61 レコーダーに記録し活性を測定した。液相での測定になるため、酸素電極による測定は湿潤時、再吸水時のみ行った。

2. 6. PAM による P700 の酸化還元測定

測定は PAM101 (Waltz, Germany) に Dual-Wavelength P700 Unit を接続して行った。測定は Light Intensity 5, GAIN 5, DAMPING 9 の設定で行った。PAM 本体からの測定光および光照射装置からの励起光を光ファイバーでまとめて 16 mm ガラス棒に導入したシステムを用いた。試料は内径 17 mm のアルミキャップに入れ、ガラス棒の途中につけたアダプターに結合させた。測定時の光照射は 8 秒行った。得られた信号は e-corder の AD 変換器を通してデジタル化し、コンピューターに保存した。デジタル化したデータを使って後の解析を行った。

2. 7. 液体窒素温度 77K での蛍光発光スペクトル測定

試料 $5 \mu\text{l}$ を濾紙上に滴下し、光が漏れないように黒色のビニールテープで直径 3 mm の石英棒に括り付け、液体窒素中に浸漬した。これに、コーニング CS4-96 青色フィルターを通した励起光を、光ファイバーを通してサンプルに照射した。測定に用いた励起光の強さは $50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。サンプル由来の蛍光は光ファイバーを通して東京インスツルメンツ社のファイバーマルチチャンネル分光器 NIR2 に導きフォトダイオードアレイ検出器で検出した。得られた蛍光発光スペクトルデータはコンピューターに保存し、後の解析をおこなった。

2. 8. アセチレン還元法による窒素固定活性測定

窒素固定能を誘導するために、窒素源である硝酸ナトリウムを除いた BG11 培地[27]中でラン藻を 1 か月培養した。*Anabaena* sp. PCC 7120 は窒素固定のためヘテロシストを誘導するので、この形成を顕微鏡で確認して以後の実験に用いた。*P. priestleyi* はヘテロシストを形成しないので *Anabaena* sp. PCC 7120 における固定能誘導も踏まえて、低窒素化合物の条件に十分順化したと考えられる時間培養を続けた後、実験に用いた。アセチレン還元法[28]を用いて *P. priestleyi*, *Anabaena* sp. PCC 7120 の窒素固定能を測定した。サンプルを密閉バイアルに入れゴム栓とアルミキャップで蓋をしカシメ機により密閉した後、窒素置換機によって嫌気状態にし 1.5 気圧に調節した。そこに 10% (v/v) になるようにアセチレンガスを封入し試料を異なる条件下に於いてそれぞれの活性を 3 週間にわたって測定した。インキュベーションする際の光を明条件 ($\text{PAR } 20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、暗条件、明暗条件 (12h 周期) に振り分け、活性を比較した。窒素固定活性は封入し

たアセチレンガスの3重結合がニトロゲナーゼによって還元されエチレンが生成される反応で測定した。バイアルからガスタイトシリンジで150 μl の気相をサンプリングし1.5気圧に加圧してからガスクロマトグラフィーに注入した。分析条件は100°CでGLサイレンス社製のPorapacTカラムに試料を導き吸着させ、これを50°Cで溶出させることでアセチレンとエチレンを分離させて定量した。

3. 結果と考察

3. 1. 低温耐性および凍結耐性

P. priestleyi とクリオコナイトにおいて、相対的電子伝達速度 (rETR) の光飽和曲線の温度依存性を測定した結果を Figure 1 に示す。クリオコナイト、*P. priestleyi* 共に rETR が最も高かったのは 25°C であった (Figure 1)。これは炭酸固定系の活性が同温度で最も高いことを示している。25°C より低温側において、クリオコナイトでは、15°C までは光強度にしたがって電子伝達活性が上昇する傾向がみえたが、*P. priestleyi* は 15°C で著しい活性の低下が見られ、300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の光強度で見かけ上 rETR の値がゼロに達した。これは炭酸固定系が律速となり電子伝達系に供給される電子が過多となって見かけ上全ての系 II が還元状態 (クローズ) になっているためである。実際の電子伝達速度はゼロではないが、系 II の酸化速度に対して還元速度が速く $F_m' = F_0'$ となるため $rETR = \{(F_m' - F_0') / F_m'\} \times PAR = 0$ と計算される。0°C では弱光下で僅かに活性が観測されたが、クリオコナイトの方が *P. priestleyi* よりも活性が高いことから、クリオコナイトは単離状態の *P. priestleyi* に比べて低温下における炭酸固定系の活性が高い、あるいは、電子伝達系の過還元状態を解消する機構が働いている可能性がある。電子伝達系の過剰な酸化還元力を安全に散逸する機構として水-水サイクルや光呼吸による還元力の消去やオレジンカロテノイドタンパク質による光エネルギーの熱散逸が知られている [29]。 *P. priestleyi* QA1 株は培養光環境が野外に比べて非常に弱光であったため、こうした強光耐性機構の誘導が不十分であった可能性がある。一方で、クリオコナイトにおいても 0°C では電子伝達活性が低いことから、氷河上の生育環境においてもクリオコナイトを形成するラン藻の光合成活性は著しく抑制されていることが示唆された。

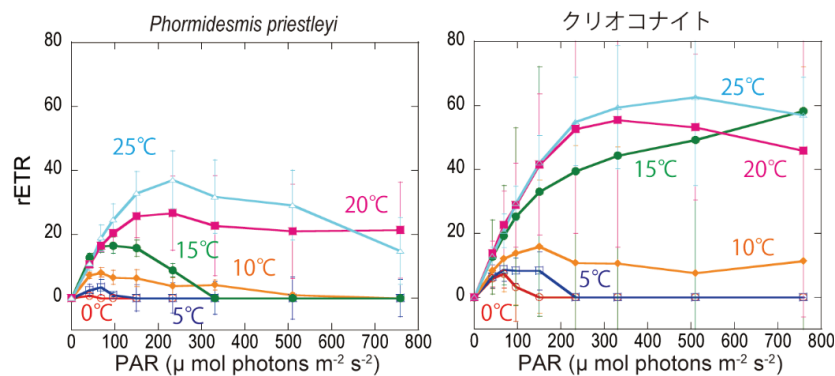


Figure 1: 異なる温度における光合成活性の光強度依存性。 *P. priestleyi* (左), クリオコナイト(右)。エラーバーは標準偏差を表す。

次に、凍結によって *P. priestleyi* の光合成活性にどのような影響があるかを調べるため、20°C で培養した細胞を -25°C で一晩凍結後ゆっくり解凍し、その後解凍した細胞を 20°C に戻し、20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ でインキュベートを行い、光-光合成曲線の変化を調べた。また、低温馴化の影響を調べるため *P. priestleyi* を 1 週間 4°C、20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ でインキュベートしたのちに同様の測定を行った。その結果を Table 1 に示す。普段から融解-再凍結サイクルに晒されている野外環境下では融解後に活性の回復が起こると考えられたが、25°C で長期培養していた *P. priestleyi* では活性の回復が全く見られなかった。一方、同一条件で培養されてきた株であっても 1 週間 4°C、20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の低温馴化を経ることで、解凍直後から光合成活性の回復が見られた。その後も速やかな活性の回復が見られ、2 日間で凍結前の活性の 70% 程度まで回復した (Table 1)。この結

果は、凍結耐性に関わる遺伝子の発現が 25°C 培養では抑制され、4°C で誘導されることを示唆している。また低温処理後の速やかな回復は *P. priestleyi* が凍結耐性を持つことを示しており、氷河上で群集を形成していなくても氷上で生存することが可能であることを示唆している。

Table 1 : 凍結融解後の光合成系の回復率測定

	回復率 (%)			
	解凍直後	1 週間	2 週間	3 週間
25°C 培養	0	0	0	0
4°C 培養 2 週間	解凍直後	1 日	2 日	3 日
		29 ± 26	64 ± 25	69 ± 34

全ての測定は 20°C で行った。凍結前の 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ における有効量子収率を 100% とし、各段階の 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ での量子収率を割合として表した。

凍結による細胞への障害は、細胞内の水が凍結する際に結晶化し、その氷結晶が成長することで物理的に細胞を傷つけることで引き起こされる[30]。ラン藻は細胞の内外に適合溶質や多糖類を蓄積することで氷結晶の成長を抑えるとともに細胞組織を保護し、細胞内の水が凍結する前に排水して乾燥状態に至ることで細胞内に氷が形成されないようにするなどの方法で凍結に耐えているとされている[31]。乾燥耐性を有する *Nostoc* 属は、細胞の水の 90% 以上を失った状態でも吸水後速やかに代謝を回復する。一方で *P. priestleyi* の乾燥耐性に関してはこれまで全く知見が無かった。そこで次に本種の乾燥耐性の有無と光合成系における乾燥応答について解析を行った。

3. 2. 光合成諸活性の乾燥応答

1) 酸素発生活性

P. priestleyi の光合成諸活性が乾燥に応じてどのように変化していくのかを測定した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 および *Anabaena* sp. PCC 7120 に対しても同様の測定を行う事で比較対象とした。*Synechocystis* sp. PCC 6803 は水棲の単細胞性ラン藻で乾燥耐性を持たないが[26]、*Anabaena* sp. PCC 7120 は糸状性ラン藻で乾燥耐性を有する[32]。これらの培養株に対して吸水・乾燥・再吸水時の光合成活性、P700 の酸化還元活性、77K 蛍光発光スペクトル測定を行い再吸水時に活性が回復するかを調べた。酸素電極による CO₂ 固定活性の測定結果を Table 2 に示す。

Table 2 : 酸素電極による乾燥処理前後の光合成活性測定結果 ($\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$)

	吸水	再吸水	回復率 (%)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	90.1 ± 27.6	0 ± 0	0
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	78.5 ± 16.2	30.2 ± 1.8	38.5
<i>Phormidesmis priestleyi</i>	116.2 ± 2.2	0 ± 0	0

乾燥耐性の有無は乾燥後の吸水回復により酸素発生活性が回復するか否かで判断した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 および *P. priestleyi* は乾燥後の再吸水による酸素発生活性の回復は全く見られなかったが、*Anabaena* sp. PCC 7120 は乾燥前の活性の 38.5% まで活性が回復した。このことから、*P. priestleyi* は *Synechocystis* sp. PCC 6803 と同様に乾燥耐性を有さないことが示唆された。*Anabaena* sp. PCC 7120 は乾燥耐性を有することが知られているが本実験での回復率が低かったことから、長期にわたる液体培養により、乾燥耐性に関連した遺伝子の発現が弱くなり乾燥耐性が不十分になった可能性が考えられた。

Synechocystis sp. PCC 6803 と *P. priestleyi* は再吸水後の光合成活性の回復が見られなかったことから、乾燥による障害が光合成システムのどこで生じているかを調べるために、さらに PAM による光化学系 I 反応中心 P700 の酸化還元、77K における蛍光発光スペクトルの測定を行った。

2) P700 酸化還元測定

吸水状態のサンプルは P700 が暗所で還元状態にあったが励起光が照射されたことにより酸化され、励起光遮断によって素早く再還元された (Figure 2).

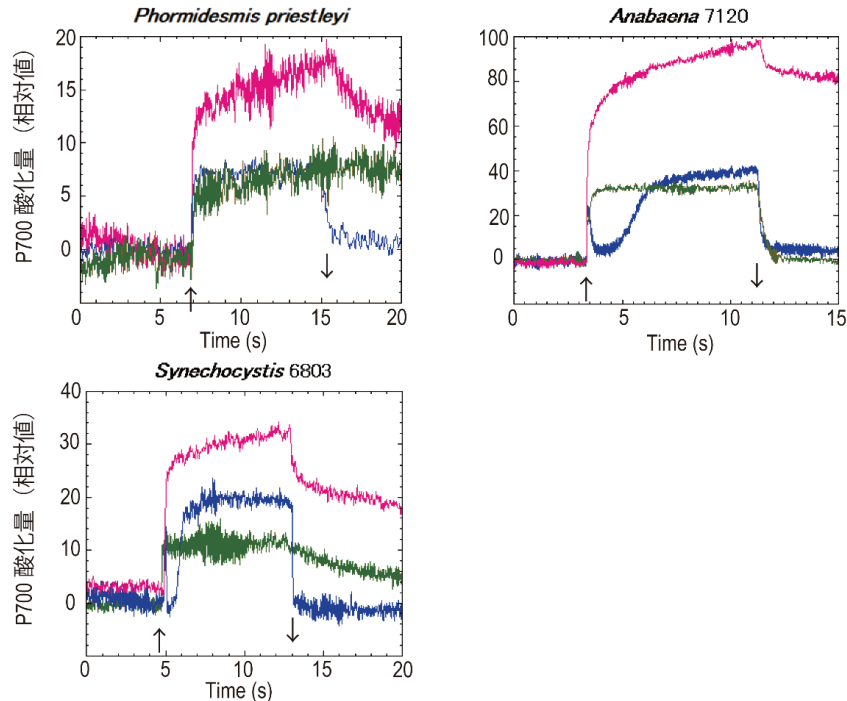


Figure 2: P700 の光酸化還元 (P700 の光応答)

PAM による P700 の酸化還元活性の測定結果を示す。

P. priestleyi および乾燥耐性種の *Anabaena* sp. PCC 7120, 非乾燥耐性種の *Synechocystis* sp. PCC 6803 の吸水 (青), 乾燥 (赤), 再吸水 (緑) で測定した P700 の光による酸化還元時間変化をそれぞれ示す。上向き, 下向きの矢印はそれぞれ励起光照射開始と終了を示す。

暗所で乾燥させた試料では P700 の光酸化量が大幅に増え, 速い酸化過程の後に緩やかな酸化が起きる 2 段階の酸化過程が観察された。光を消した後一部が速やかに再還元されたが, 大部分は再還元されなかった。これらの結果は, どの種においても乾燥状態では P700 が不可逆的に光酸化され, 電子伝達系から P700 への新たな電子の供給が阻害されていることを示している。優れた乾燥耐性をもつイシクラゲ (*Nostoc commune*) の場合は, 乾燥状態で P700 の光酸化も抑制されることが知られているが[26], P700 の不可逆的酸化状態は実質的な不活性化状態であるため, 過剰な電子の放出による活性酸素の生成を防止する点で同等の光障害防御機構と言える[33]。

再吸水後に行った測定では, 試料により反応は異なっていた。乾燥耐性を持たない *Synechocystis* sp. PCC 6803 では光酸化量が減り, 酸化後の再還元はほとんど起きず再還元速度が乾燥前の試料に比べて著しく遅くなった。これは, P700 は機能しているが, 電子供与体である系 II あるいは系 II から系 I への電子伝達系が障害を受けたため P700 が再還元されないことを示している。対照的に *Anabaena* sp. PCC 7120 では光酸化量は乾燥前の状態と同じ程度になり, 還元速度が吸水時と同程度まで戻った。これは P700 の電子供与体 (系 II) も再吸水で元の状態に戻っていることを示している。ただし, 吸水状態では見られた光照射中の一過性の酸化と還元はおきていなかった。再吸水後の時間を延ばせば同じ状態に戻るのか, それともこのまま戻らないのかはさらに検証を行う必要がある。*P. priestleyi* QA1 は, *Synechocystis* 6803 と同様に光酸化量は乾燥前の試料と同じ強度まで戻ったが, 再還元は全く起きなかった。このことは, 乾燥によって系 II - 系 I 間の電子伝達に加えて系 I 周りの環状電子伝達系が障害を受けたことを示唆している。つまり, *P. priestleyi* は乾燥によって直鎖と環状の両電子伝達活性が失活したと推測される。

3) クロロフィル蛍光測定

低温蛍光発光スペクトルは、光化学系タンパク質の系 I, 系 II, そしてアンテナタンパク質であるフィコビリソームに結合した光合成色素の脱励起に伴う蛍光発光を測定したものである。既存の光合成研究論文から各バンドの帰属は次のように理解される。710 nm~740 nm 付近の蛍光 (F730) は系 I から、695 nm・685 nm の蛍光 (F685, F695) は系 II から発光するが、685 nm の蛍光はほかに系 II とフィコビリゾームとの結合を手助けするリンカータンパク質にも起因する。660 nm 付近の蛍光 (F660) はアロフィコシアニン、640 nm 付近の蛍光 (F640) はフィコシアニンからそれぞれ出ている (Figure 3)。これらの発光バンドは吸水試料ではすべての試料で確認された (Figure 4)。

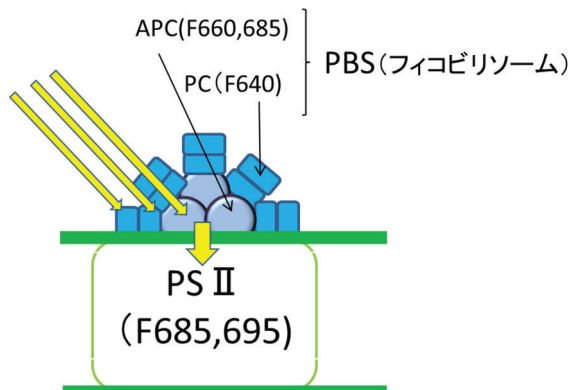


Figure 3: 光補修系と系 II の 77K における蛍光発光値の模式図
シアノバクテリアにおける光化学系 II とそのアンテナタンパク質 (PBS) から放出されるクロロフィル蛍光の模式図を示す。黄色の矢印は光およびエネルギーの移動過程を示す。F660, 685, 640, 695 は 77K での蛍光発光スペクトルにおけるピーク波長を示す。

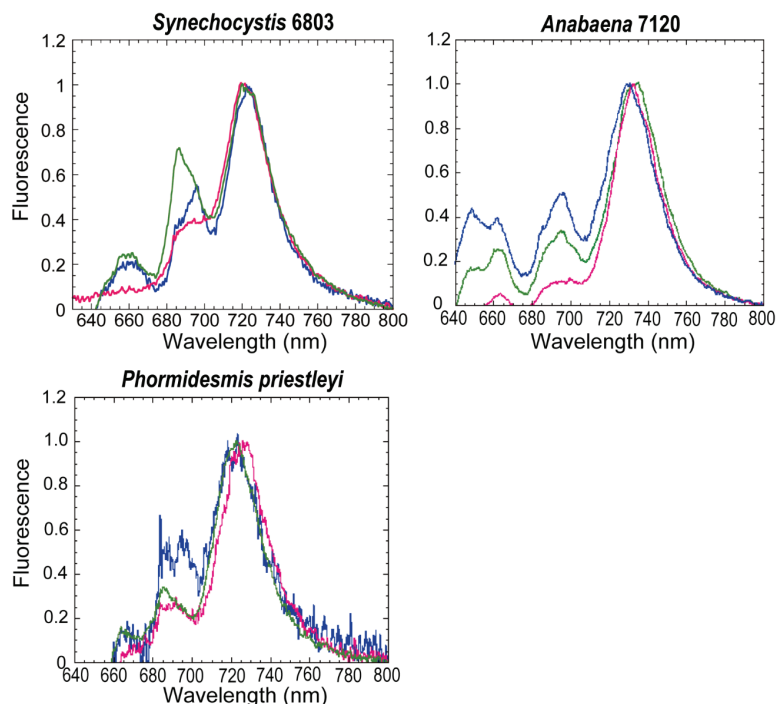


Figure 4: 77K におけるクロロフィル蛍光発光スペクトル

P. priestleyi および乾燥耐性種の *Anabaena* sp. PCC 7120, 非乾燥耐性種の *Synechocystis* sp. PCC 6803 の吸水 (青), 乾燥 (赤), 再吸水 (緑) で測定した液体窒素温度 (77K) でのクロロフィル蛍光発光スペクトルを示す。

Synechocystis 6803 の吸水状態と乾燥状態のスペクトルを比較すると F730 に対する F685, F695 の蛍光強度が乾燥状態で約 1/2 になり、系 I に関しても波形のピークが 730 nm から 720 nm へシフトしていることがわかった。また、F660 は顕著に消光した。消光したという事は、フィコビリソームに吸収された光エネルギーが非常に速い速度で熱散逸されアロフィコシアニンの励起が抑えられたことを示している。フィコビリソームにおける蛍光消光の詳細は明らかにされていないが、乾燥状態では系 II が失活するため、光エネルギーが系 II に渡らないようアンテナタンパク質で積極的に熱散逸する乾燥誘導性の機構が存在していると考えられる。これは光酸化された P700 が再還元されないという説と矛盾しない。再吸水により系 I に対する系 II およびフィコビリソームからの蛍光は増加したが、系 I のピークは乾燥前よりも短波長側にシフトしていた。系 II からの蛍光は乾燥前では F695 が F685 よりも大きく見えていたが、再吸水時には逆転し、F685 の蛍光値の方が大きくなっていった。これは、吸水時にはアンテナタンパク質（フィコビリソーム）から系 II へのエネルギー伝達が行われていたが、乾燥状態を経ることによって何らかの理由でアンテナタンパク質と系 II 間の伝達できていたエネルギーが伝えられず、フィコビリソームの一番中心にあるリンカーから蛍光が発光する分（F685）が加わったためと考えられる。

Anabaena sp. PCC 7120 でも乾燥させると同様に系 I のピークの短波長側へのシフトが見られた。また、F685, F695 はほとんど消光し、フィコシアニンからの蛍光（F640, F660）もほぼ消光した。しかし、再吸水によりこれらの蛍光は乾燥前の状態にほぼ回復した。乾燥耐性を持つ *Anabaena* sp. PCC 7120 においても乾燥による系 I 蛍光ピークの短波長シフトが検出されたことから、このピークのずれは P700 もしくは系 I 複合体の失活とは直接には関係していないことが分かった。

4) 乾燥応答から推察される凍結耐性の特性

気温が 0°C 以下まで下がると、環境中の水が凍結し細胞外部の水ポテンシャルが下がることで細胞内の水の外部への排出が促進されるため、生物は凍結ストレス下で乾燥や浸透圧ストレスに晒される。*P. priestleyi* は氷河上に生育し、冬期は氷河表面の水が完全に凍結すること、またクリオコナイトの構成種となる *Nostoc* 属は優れた乾燥耐性を有していることから本種も乾燥耐性種である可能性があると考えた。しかし、*P. priestleyi* は乾燥耐性を持たない *Synechocystis* sp. PCC 6803 と同様のスペクトル変化を示した。F730 に対する F685, F695 の蛍光強度は乾燥に伴いほぼ 1/2 になったが、再吸水でも蛍光強度はあまり回復せず、F685 の方が F695 よりも強かった。系 I の蛍光のピークは乾燥により長波長側に若干シフトしていた。これらの結果から、*P. priestleyi* は乾燥耐性機構を有さない可能性が示された。氷河上では優占種となる *P. priestleyi* が、より乾燥状態にある氷河後退域土壌の細菌叢解析では検出量が極端に少ないことも、本種が乾燥耐性を有していないという説と矛盾しない。*P. priestleyi* は乾燥に対して耐性を示さないため、細胞外に排出されている多糖類は乾燥耐性にほとんど寄与していないと考えられる。また凍結条件では細胞内から外部への水の排出は抑制されている可能性が高い。凍結耐性を持つ真核生物においては不凍タンパク質が細胞内における氷結晶の成長を抑制することが知られている[34]。同様の働きをするタンパク質としてバクテリアでは Ice-binding proteins (IBPs) が知られているが、ラン藻では IBPs を持つ種は存在しないとされていた。しかし、2016 年に南極産の *Nostoc* 属のゲノム配列に他のバクテリアから水平伝播したと考えられる IBPs の配列が初めて報告された[35]。データベース上の *P. priestleyi* のゲノム配列に IBPs の遺伝子は見つかっていないことから、本種は別の方法で凍結障害を防いでいると考えられる。*P. priestleyi* の細胞内に蓄積された適合溶質や多糖類が細胞内での凍結抑制と水分子の維持に関わっている可能性がある。また、IBPs は細胞外部にも排出されることから、クリオコナイトに共生する別のバクテリアが生成した IBPs が *P. priestleyi* の凍結耐性に寄与している可能性も考えられる。今後の研究でさらに細かい反応機構について研究を進める必要がある。

3. 3. 窒素固定活性の測定

メキシコの温泉から *Phormidesmis priestleyi* Ana と名付けられたラン藻が単離され、ゲノム解析がなされた結果、窒素固定にかかわる遺伝子が多数存在することが報告された。一方で、氷河上のクリオコナイトから *P. priestleyi* を単離しゲノム解析を行った論文も発表され、本種が非ヘテロシスト型光合成を行う *Leptoryngbya boryana* と近縁種であることが報告された[17]。しかし、この論文で解析されたゲノムからは

ニトロゲナーゼをコードする遺伝子に相同な配列は見つからなかった。これら 2 本の論文から、*P. priestleyi* は株レベルで窒素固定能が変化すると考えられた。そこで、本実験で使用した *P. priestleyi* QA1 株のニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元法を用いて調べた。各光条件におけるニトロゲナーゼによるエチレンの生成量を Figure 5 に示す。連続光条件では、ニトロゲナーゼ活性は 1 週間後、3 週間後共に極めて低かった。一方で常時暗所の条件下では、明瞭にエチレンの生成が見られた。ただし暗所条件では、光合成反応によるエネルギー生産が行われずアセチレン還元に必要なエネルギーが枯渇すると考えられた。そこで 12 時間光照射—12 時間暗所条件での活性を計測したところ、24 時間暗所条件と同程度のエチレンの生成がおきた。

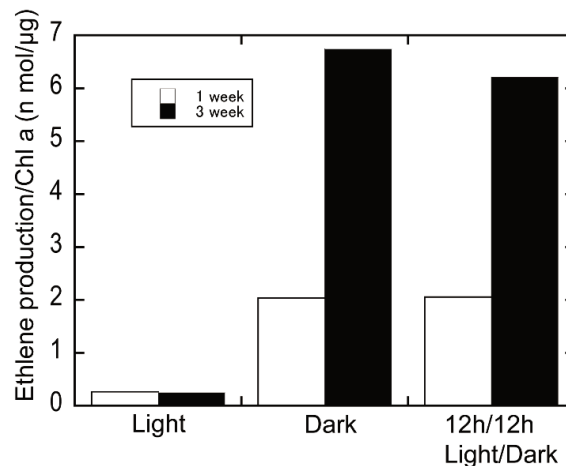


Figure 5: *P. priestleyi* のニトロゲナーゼ活性の光依存性

アセチレン還元法で測定した *P. priestleyi* 培養株の 20℃におけるニトロゲナーゼによるエチレンの生成量。24 時間光条件、24 時間暗所条件、12 時間/12 時間明暗周期の条件で 1 週間後と 3 週間後に測定を行った (n=1)。

ラン藻の窒素固定はヘテロシスト型か非ヘテロシスト型の大きく 2 つのタイプに分けられる。ヘテロシストは *Nostoc* 属などにみられる数珠状細胞内にまばらに形成される比較的大きな細胞で、光合成を行わず窒素固定のみを行うことが特徴である。ニトロゲナーゼは酸素に対して感受性が高く、速やかに不可逆的に失活してしまうため、恒常的に酸素を発生し続ける植物とは相性の悪い酵素である。しかし、ヘテロシストを有していれば光合成を行う細胞と窒素固定を行う細胞が完全に分かれるため日中でも酸素によって失活することなく働くことが可能である。逆に非ヘテロシスト型の窒素固定を行うラン藻は日中に光合成、夜間に窒素固定を行うしかなく、比較的効率の悪い窒素固定を行っている。Figure 5 の結果は明暗、暗条件でのみ窒素固定が見られており、*P. priestleyi* は非ヘテロシスト型の窒素固定を行っている可能性が示唆された。顕微鏡観察ではヘテロシスト形成が確認できなかったことから、この結果を支持している。一方で 12h/12h 明暗条件と暗条件ではエチレン生成量に大きな違いが見られなかったが、12h/12h 明暗条件では常時暗所に比べてアセチレン還元が可能な時間が 2 分の 1 になることから、実質的な時間当たりのニトロゲナーゼ活性は暗条件の 2 倍になっていると考えられる。

参考としてヘテロシスト型の窒素固定を行う *Anabaena* sp. PCC 7120 で同様の実験を行ったところ、暗所ではほとんど活性は見られなかったが、明および明暗条件でかなり強いニトロゲナーゼ活性を検出した(データ略)。アセチレン還元に必要なエネルギー(還元力と ATP)は光合成で作られるため、光が当たる条件でのみニトロゲナーゼによるエチレンの生成が起これ、ヘテロシスト型のニトロゲナーゼ活性が明条件下で検出できたと考えられる。以上の 2 点から、今回用いた測定系はニトロゲナーゼの活性を検出する十分な感度があり、ヘテロシスト型と非ヘテロシスト型のアセチレン還元を区別して測ることが出来ていると結論付けた。

P. priestleyi QA1 株がニトロゲナーゼ活性を有することが示されたが、得られたのは培養に至適な 20°C の活性であり、実際の野外環境でニトロゲナーゼが働いているのかはわからなかった。そこで 4°C, 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件、かつ窒素源を含まない培養を 1 週間行っただけでニトロゲナーゼ活性を測定した (Figure 6)。4°C でインキュベートしたものから一週間ごとに試料を採取して測定し、3 週間までの測定を 3 反復で行った。この結果、2 反復から非常に微量ながらもエチレンの生成を検出することが出来た (Figure 6)。この結果から本種は低温でも活性を持つニトロゲナーゼを有していることが示唆された。ただ、野外では 0°C 付近の氷上に生育していることから、4°C で測定した今回の活性より更に抑制されている可能性がある。更に、高緯度地域の氷河は真夏に白夜期間があり 24 時間明条件に置かれることから、非ヘテロシスト型の窒素固定がどの程度有効であるかは疑問が残る。実際に野外でニトロゲナーゼ活性を測定した例はあるが [10,11]、一部地域の *Leptolyngbia* が優占するクリオコナイトではラン藻由来の *nif* 遺伝子は発現していなかった [5]。光環境の変動や環境中のアンモニアや硝酸イオン濃度によってもラン藻の窒素固定活性は影響を受けるため、今後更に生育環境下での窒素固定についてデータの蓄積が必要である。

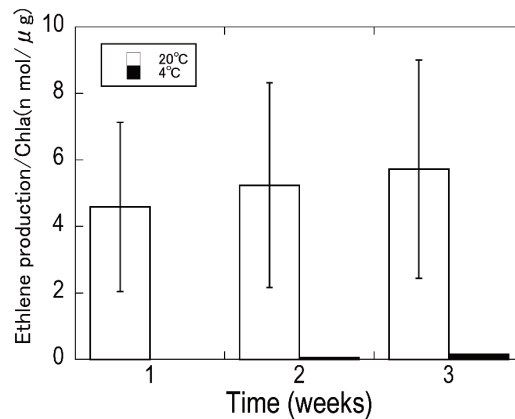


Figure 6: *P. priestleyi* のニトロゲナーゼ活性の温度依存性

P. priestleyi 培養株を用いてアセチレン還元法により測定した 20°C と 4°C のニトロゲナーゼ活性。光条件は 12 時間/12 時間の明暗周期。エラーバーは標準偏差を示す。20°C は別々に準備したバイアル 3 本、4°C は 2 本の結果を示している。

4. 結語

氷雪ラン藻 *P. priestleyi* は、氷河融解時期の 0°C 付近の環境で光合成活性と窒素固定活性を維持できることから、クリオコナイトの一次生産者となり氷河上の微生物生態系の維持やクリオコナイトの増殖に大きく関わっていることが示唆された。一方で、乾燥耐性を示さず、低温馴化後も凍結により光合成系に障害を受けることから、氷河上の環境でも融解凍結サイクルにより障害を受け代謝が大きく変動している可能性がある。こうした性質は、クリオコナイト内の微生物生態系の物質循環に影響を与える。

乾燥耐性を有さないラン藻が凍結に耐える例はこれまで報告されていない。したがって、本種は既存の認識とは異なる方法で融解凍結サイクルに対応することで氷河上という極限環境に適応していると考えられる。本種の培養株は増殖速度が非常に遅く実験で取り扱いが難しいため、限られた条件での実験しか行うことができなかったが、*P. priestleyi* の生理学的特性の一端を初めて明らかにすることができた。今後、凍結耐性機構や窒素固定能について更に解析し、その詳細を明らかにする必要がある。

5. 謝辞

この研究は、2016、2017 年度中央大学共同研究プロジェクト、研究課題名「極貧栄養環境に構築されるバクテリア群集の物質循環」の一環として同プロジェクトからの助成を受け行われました。

Ny-Ålesund における野外活動は、国立極地研究所国際北極環境研究センター支援の元、研究プロジェクト “Response of high Arctic tundra ecosystem to climate change” (代表：内田雅己博士, Research in Svalbard ID:3156) の一部として行われました。国立極地研究所の内田雅己博士には、野外調査に関する諸手続きや現地での活動に御助言と御支援を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Leslie, A: “The Arctic voyages of Adolf Erik Nordenskiöld. 1858-1879” Macmillan and Co., London, UK,1879
- [2] Takeuchi, N., Kohshima, S., Goto-Azuma, K., Koerner, R.M.: *Biological characteristics of dark colored material (cryoconite) on Canadian Arctic glaciers (Devon and Penny ice caps)*, Mem. Natl. Inst. Polar Res. Special Issue **54**,495-505, 2001
- [3] Langford, H., Hodson, A., Banwart, S., Bøggild, C.: *The microstructure and biogeochemistry of Arctic cryoconite granules*. Ann. Glaciol. **51**(56), 87–94, 2010
- [4] Yallop, M. L., Anesio, A. M., Perkins, R. G., Cook, J., Telling, J., Fagan, D., MacFarlane, J., Stibal, M., Barker, G., Bellas, C., Hodson, A., Tranter, M., Wadham, J., Roberts, N. W.: *Photophysiology and albedo-changing potential of the ice algal community on the surface of the Greenland ice sheet*. ISME J, **6** (12), 2302–2313,2012
- [5] Segawa, T., Takeuchi, N., Mori, H., Rathnayake, R. M. L. D., Li, Z., Akiyoshi, A., Satoh, H., Ishii, S.: *Redox stratification within cryoconite granules influences the nitrogen cycle on glaciers*. FEMS Microbiol. Ecol., **96** (11), fiae199, 2020
- [6] Christmas, N. A. M., Anesio, A. M., Sánchez-Baracaldo, P.: *Multiple adaptations to polar and alpine environments within cyanobacteria: A phylogenomic and 12ayesian approach*. Front. Microbiol., **6**, 01070, 2015
- [7] Uetake, J., Nagatsuka, N., Onuma, Y., Takeuchi, N., Motoyama, H., Aoki, T.: *Bacterial community changes with granule size in cryoconite and their susceptibility to exogenous nutrients on NW Greenland glaciers*. FEMS Microbiol. Ecol., **95** (7), fiz075, 2019
- [8] Rozwalak, P., Podkowa, P., Buda, J., Niedzielski, P., Kawecki, S., Ambrosini, R., Azzoni, R. S., Baccolo, G., Ceballos, J. L., Cook, J., Di Mauro, B., Ficetola, G. F., Franzetti, A., Ignatiuk, D., Klimaszczak, P., Łokas, E., Ono, M., Parnikoza, I., Pietryka, M., Pittino, F., Poniecka, E., Porazinska, D. L., Richter, D., Schmidt, S. K., Sommers, P., Souza-Kasprzyk, J., Stibal, M., Szczuciński, W., Uetake, J., Wejnerowski, Ł., Yde, J. C., Takeuchi, N., Zawierucha, K.: *Cryoconite – From minerals and organic matter to bioengineered sediments on glacier’s surfaces*. Science of The Total Environment, **807**, 150874, 2022
- [9] Uetake, J., Tanaka, S., Hara, K., Tanabe, Y., Samyn, D., Motoyama, H., Imura, S., Kohshima, S.: *Novel biogenic aggregation of moss gemmae on a disappearing African glacier*. PloS One, **9** (11), e112510, 2014
- [10] Telling, J., Anesio, A. M., Tranter, M., Irvine-Fynn, T., Hodson, A., Butler, C., Wadham, J.: *Nitrogen fixation on Arctic glaciers, Svalbard*. Journal of geophysical research.: Biogeosci., **116** (G3), 2011
- [11] Telling, J. P., Stibal, M., Anesio, A. M., Tranter, M., Nias, I., Cook, J., Bellas, C. M., Lis, G., Wadham, J. L., Sole, A., Nienow, P., Hodson, A.: *Microbial nitrogen cycling on the Greenland ice sheet*. Biogeosci., **9**, 2431–2442, 2012
- [12] Segawa, T., Takeuchi, N., Mori, H., Rathnayake, R. M. L. D., Li, Z., Akiyoshi, A., Satoh, H., Ishii, S.: *Redox stratification within cryoconite granules influences the nitrogen cycle on glaciers*. FEMS Microbiol. Ecol., **96** (11), fiae199, 2020
- [13] Segawa, T., Takeuchi, N., Fujita, K., Aizen, V. B., Willerslev, E., Yonezawa, T.: *Demographic analysis of cyanobacteria based on the mutation rates estimated from an ancient ice core*. Heredity, **120** (6), 562–573, 2018

- [14] Gokul, J. K., Cameron, K. A., Irvine-Fynn, T. D. L., Cook, J. M., Hubbard, A., Stibal, M., Hegarty, M., Mur, L. A. J., Edwards, A. *Illuminating the dynamic rare biosphere of the Greenland ice sheet's dark zone*. FEMS Microbiol. Ecol., **95** (12), fiz177, 2019
- [15] Komárek, J., Kaštovský, J., Ventura, S., Turicchia, S. Š.: *The cyanobacterial genus Phormidesmis*. Algological studies, **129**, 41–59, 2019
- [16] Zeng, Y.-X., Yan, M., Yu, Y., Li, H.-R., He, J.-F., Sun, K., Zhang, F.: *Diversity of bacteria in surface ice of Austre Lovénbreen glacier, Svalbard*. Arch Microbiol, **195** (5), 313–322, 2013
- [17] Christmas, N. A. M., Barker, G., Anesio, A. M., Sánchez-Baracaldo, P.: *Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium Phormidesmis priestleyi BC1401*. BMC Genomics, **17** (1), 533, 2016
- [18] Takeuchi, N., Nishiyama, H., Li, Z.: *Structure and formation process of cryoconite granules on Ürümqi glacier No. 1, Tien shan, China*. Ann. Glaciol., **51** (56), 9–14, 2010
- [19] Lin Y., Hirai M., Kashino Y., Koike H., Tuzi S. and Satoh K.: *Tolerance to freezing stress in cyanobacteria, Nostoc commune and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress*. Polar Biosci. **17**, 56-68, 2004
- [20] Bailey, S., Grossman, A.: *Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting*. Photochem. Photobiol., **84** (6), 1410–1420, 2008
- [21] Ogawa T., Misumi M. and Sonoike K.: *Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse-amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions*. Photosynth Res **133**, 63-73, 2017
- [22] Tyystjärvi, E.: *Photoinhibition of Photosystem II*. Int Rev Cell Mol Biol, **300**, 243–303, 2013
- [23] Sonoike, K.: *Photoinhibition of Photosystem I*. Physiol Plant, **142** (1), 56–64, 2011
- [24] Schreiber, U.: *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview*. Papageorgiou, G. C., Govindjee (Eds) “In Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis” Advances in Photosynthesis and Respiration; Springer Netherlands: Dordrecht, 279–319, 2004
- [25] Satoh, K., Hirai, M., Nishio, J., Yamaji, T., Kashino, Y., Koike, H.: *Recovery of photosynthetic systems during rewetting is quite rapid in a terrestrial cyanobacterium*, Nostoc Commune. Plant Cell Physiol, **43** (2), 170–176, 2002
- [26] Hirai, M., Yamakawa, R., Nishio, J., Yamaji, T., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K.: *Deactivation of photosynthetic activities is triggered by loss of a small amount of water in a desiccation-tolerant cyanobacterium*, Nostoc Commune. Plant Cell Physiol, **45** (7), 872–878, 2004
- [27] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., B., Herdman, M., Stanier, R., Y.: *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*, J. Gen. Microbiol. **111**, 1-61, 1979
- [28] Dilworth, M. J. Acetylene: *Reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, **127** (2), 285–294, 1966
- [29] Kirilovsky, D., Kerfeld, C. A.: *Cyanobacterial photoprotection by the orange carotenoid protein*. Nat Plants, **2** (12), 16180, 2016
- [30] Kawahara, H. *Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins*. Margesin, R. (Ed) “Psychrophiles: From Biodiversity

to Biotechnology” Springer International Publishing: Cham, 237–257, 2017

- [31] Vincent W.: *Cold tolerance in cyanobacteria and life in the cryosphere*. J. Seckbach (Ed) “Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments” Springer Dordrecht, 287-301, 2007
- [32] Katoh, H., Asthana, R. K., Ohmori, M.: *Gene expression in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC7120 under desiccation*. *Microb Ecol*, **47** (2), 164–174, 2004
- [33] Kosugi, M., Arita, M., Shizuma, R., Moriyama, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K.: *Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts*. *Plant Cell Physiol*. **50** (4), 879–888, 2009
- [34] Singh, P., Hanada, Y., Singh, S. M., Tsuda, S. : *Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria*. *FEMS Microbiol. Letters*, **351** (1), 14–22, 2014
- [35] Raymond, J. A., Janech, M. G., Mangiagalli, M.: *Ice-binding proteins associated with an Antarctic cyanobacterium, Nostoc sp. HGI*. *Appl Environ Microbiol*, **87** (2), e02499-20, 2021